

فرم پیشنهادی پایان نامه کارشناسی ارشد
(ح) اطلاعات مربوط به عنوان پایان نامه :

عنوان فارسی پایان نامه :

طراحی، ساخت و تعیین ویژگی یک آنزیم تری گلیسرید لیپاز جدید باکتریایی از طریق جهش زایی هدفمند

عنوان لاتین پایان نامه:

Design, development and characterization of a novel bacterial triglyceride lipase enzyme through site-directed mutagenesis

واژگان کلیدی لاتین:

triglyceride lipase, site-directed mutagenesis, enzyme

واژگان کلیدی فارسی:

تری گلیسرید لیپاز، جهش زایی هدفمند، آنزیم

لیپازها از لحاظ ساختاری عضو خانواده بزرگ α/β هیدرولازها می‌باشند. ساختار معمول α/β هیدرولازها دارای ۸ زنجیره موازی β (که فقط زنجیره دوم در جهت موازی مخالف قرار گرفته است) و تعدادی مارپیچ α است. این ۸ زنجیره β صفحه‌ای را می‌سازند که مایل است و منجر به ایجاد زاویه ۹۰ درجه‌ای بین اولین زنجیره و آخرین زنجیره β می‌شود. در دو طرف این صفحه β زنجیره‌های α قرار می‌گیرند. این مارپیچ‌ها به صورتی قرار می‌گیرند که اولین و آخرین مارپیچ α در یک سوی صفحه β مرکزی و سایر زنجیره‌های α در سوی دیگر آن قرار می‌گیرند. فعالیت α/β هیدرولازها بر پایه یک جایگاه سه‌تایی کاتالیزی است که شامل: یک اسیدآمینه هسته‌دوست (سرین، سیستئین یا اسپارتات)، یک اسیدآمینه اسیدی (آسپارتات یا گلوتامات) و اسیدآمینه هیستیدین می‌باشد. این سه اسیدآمینه در ساختار اولیه α/β هیدرولازها به ترتیب اسیدآمینه هسته‌دوست، اسیدآمینه اسیدی و هیستیدین نام دارند که اسیدآمینه هسته دوست سرین معمولاً در پنتا پپتید حفظ شده Gly-X-Ser-X-Gly قرار دارد. این توالی در بسیاری از لیپازهای میکروبی حفاظت شده می‌باشد. در این آنزیم همانند سایر لیپازهای باسیلوسی گلیسین اول پنتاپپتید Gly-X-Ser-X-Gly ناحیه هسته دوست، با یک آلانین جایگزین شده است (Ala-Xaa-Ser-Xaa-Gly). این توالی ناحیه زانوی هسته دوست بین مارپیچ $\alpha 4$ و زنجیره $\beta 5$ در عمق هسته مرکزی قرار گرفته است. در این توالی Xaa به ترتیب اسیدآمینه هیستیدین و اسیدآمینه گلوتامات می‌باشند. در این تحقیق برای پی بردن به علت تفاوت این توالی پنتاپپتیدی در آنزیم لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس، با اعمال جهش در ژن تولید کننده آنزیم برآنیم که دریا بیم چرا باوجود conserve بودن این توالی، در این گونه باکتریایی تفاوت‌هایی مشاهده می‌شود. از اینرو این توالی با موارد مشابه در دیگر گونه‌ها که لیپاز مطلوبی دارند و در بیوتکنولوژی به وفور استفاده می‌شوند جایگزین می‌گردد. همچنین برآنیم که اثر این تغییرات را در تغییر ساختمان فضایی و خصوصیات کینتیکی آنزیم بررسی نماییم.

امروزه دانش آنزیمولوژی تحول عمیقی در صنایع و بیوتکنولوژی ایجاد نموده است. درآمد حاصل از آنزیم های صنعتی تا دهه ۶۰ میلادی تنها چند هزار دلار در سال بود اما با رشد چشمگیر این صنعت در سالهای اخیر این درآمد افزایش یافته است. امروزه بیشتر آنزیم ها با فرمانتاسیون مواد با پایه زیستی تهیه می شوند. تکنیک های مهندسی پروتئین برای تولید آنزیم های صنعتی بسیار کارآمد هستند. آنزیم های هیدرولیتیکی همچون پروتئازها، آمیلازها، آمیلازها، استرازاها و لیپازها بخش عمده ای از داد و ستد آنزیم های صنعتی (حداقل ۷۵ درصد) را در بر می گیرند. در این میان لیپازها به خاطر کاربرد گسترده در صنایع مختلف از قبیل تولید شوینده ها، صنایع غذایی، صنایع کاغذ سازی و غیره اهمیت فراوانی داشته و به عنوان موضوع مهمی تحت مطالعه و بررسی هستند.

لیپازهای ترموفیل بدست آمده از منابع میکروبی برای کاربردهای بیوتکنولوژی بسیار سودمند هستند زیرا می توانند با هزینه کم تولید شده و پایداری بهبود یافته ای از خود نشان دهند. در سالهای اخیر تقاضای زیادی برای آنزیم های مقاوم به حرارت در زمینه های صنعتی ایجاد شده است. بنابراین لیپازهای مقاوم به حرارت از منابع گوناگون خالص و خصوصیتیابی شده است.

در این تحقیق کار بر روی یک لیپاز ترموفیل که از باکتری باسیلوس ترموکاتنولاتوس گرفته شده صورت می گیرد که با توجه به مطالب ذکر شده در بالا و از طرفی عدم تولید آنزیم های لیپاز در کشور و هزینه های بسیار زیادی که صرف واردات آنزیم لیپاز می شود، تحقیق و بررسی این آنزیم و برداشتن گام هایی در جهت کمک به تولید این آنزیم در کشور ضروری به نظر می رسد.

۱) از نظر ساختار، لیپازها در گروه α/β هیدرولازها قرار می گیرند.

۲) بسیاری از اعضای خانواده α/β هیدرولازها دارای ضمامی بنام سرپوش، کلاهک هستند که به صورت لوپهایی در بخش کربوکسیلیک پروتئین قرار دارند و نقش مهمی در شکل گیری آنزیم دارند.

۳) فعالیت α/β هیدرولازها بر پایه یک جایگاه سه تایی کاتالیزی است که شامل: یک اسیدآمینه هسته دوست، یک اسیدآمینه اسیدی و اسیدآمینه هیستیدین می باشد.

۴) اسیدآمینه هسته دوست سرین معمولاً در پنتاپتید حفظ شده Gly-X-Ser-X-Gly قرار دارد.

۵) اسیدآمینه کاتالیزی هسته دوست در یک لوپ بین زنجیره β و مارپیچ α قرار گرفته و یک موتیف ساختاری بنام زانوی هسته دوست را به وجود می آورد.

۶) زانوی هسته دوست به اسیدآمینه هسته دوست اجازه می دهد که در جایگاه فعال آنزیم آزاد بوده و از یک طرف به اسیدآمینه هیستیدین و از طرف دیگر به سوبسترا دسترسی داشته باشد.

۷) پروتئینهایی که از باکتریهای ترموفیل (گرما دوست) گرفته می شوند، معمولاً پایداری ترمودینامیکی بالایی در دماهای بالا و حلالهای آلی از خود نشان می دهند.

۸) جایگاه فعال آنزیم لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس همانند سایر لیپازها از سرین-۱۱۴، آسپارتات-۳۱۸ و هیستیدین-۳۵۹ تشکیل شده و با وجود این تشابه، توالی ناحیه نوکلئوفیلیک این آنزیم با بسیاری از لیپازها متفاوت است.

۶) هدف ها :

در این تحقیق هدف اعمال جهش در ناحیه زانوی هسته دوست آنزیم لیپاز باسیلوس ترموکاتنولاتوس و سپس اثر این تغییر بر ساختمان دوم و سوم آنزیم و فعالیت آن مورد بررسی قرار می گیرد.

۷) کاربردهای متصور از تحقیق:

لیپازها به دلیل خصوصیات مطلوبشان از قبیل عدم نیاز به کوفاکتور ، پایداری و فعالیت کاتالیتیکی در محیطهای غیر معمول، طیف وسیعی از سوبستراها را هیدرولیز می کنند و در صنایع گوناگون از جمله تولید شوینده ها، صنایع کاغذی، صنایع غذایی و غیره کاربردهای مختلفی دارند، از لحاظ اقتصادی بسیار مورد توجه اند.

مهمترین کاربرد لیپازها در تولید شوینده می باشد و برای اینکار لیپاز باید به حرارت مقاوم باشد به همین دلیل آنزیمهای ترموفیل و موجودات تولیدکننده این آنزیمها بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. یکی از باکتریهایی که لیپاز ترموفیل تولید می کند، باکتری باسیلوس ترموکاتنولاتوس است. فعالیت مطلوب این لیپاز در ۶۰ الی ۶۵ درجه سانتیگراد است.

۸) مراجع استفاده کننده از نتیجه پایان نامه :

در صورت حصول نتایج مورد انتظار، از این لیپاز مهندسی شده می توان در

- ۱) صنایع تولید مواد شوینده،
- ۲) صنعت پارچه
- ۳) تواید پلیمر های قابل تجزیه
- ۴) تولید بیودیزل ها

استفاده نمود.

۹) روش انجام تحقیق:

۹-۱) روش و ابزار گرد آوری اطلاعات :

الف) فاز مطالعاتی

استفاده از نرم افزار های بیوانفورماتیکی نظیر **Editseq** و **Swiss-Pdb viewer**
استفاده از پایگاه های اطلاعاتی اینترنتی **PSSPRED** و **YASPIN**

ب) فاز آزمایشگاهی

استخراج **DNA** از باکتری و حصول ژن آنزیم مورد نظر از طریق **PCR**
کلون سازی ژن مورد نظر به درون وکتور مناسب
اعمال جهش روی ژن مورد نظر با استفاده از جهش زایی تغییر سریع
تایید جهش از طریق تعیین توالی ژن
انتقال محصول **PCR** به باکتری و حصول پلازمید موتانت
انتقال پلازمید به سلول یوکاریوت و حصول پروتئین نو ترکیب
بررسی های ساختاری و کینتیکی آنزیم

۹-۲) روش تجزیه و تحلیل داده ها

تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار **SPSS** ، و نیز از طریق مقایسه های ساختاری و عملکردی پروتئین های طبیعی و موتانت صورت می گیرد.

۹-۳) قلمرو تحقیق (زمانی ، مکانی ، موضوعی) :

۱۰) جامعه آماری و روش نمونه گیری

این بخش مختص رشته های علوم انسانی است.

1. Holmquist, M., 2000. Alpha beta-hydrolase fold enzymes structures, functions and mechanisms. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), pp.209–235
2. Thirstrup, K., Verger, R & Carrière, F., 1994. Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. *Biochemistry*, 33(10), pp.2748-2756
3. Secundo, F. et al., 2006. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4), pp.166-170
4. Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, pp.763-781
5. Radić, Z., Reiner, E. & Taylor, P, 1991. Role of the peripheral anionic site on acetylcholinesterase: inhibition by substrates and coumarin derivatives. *Molecular Pharmacology*, 39(1), pp.98 -104
6. van Pouderoyen, G et al., 2001. The crystal structure of Bacillus subtilis lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology*, 309(1), pp.215-226
7. Tyndall, J.D.A. et al., 2002. Crystal Structure of a Thermostable Lipase from Bacillus stearothermophilus P1. *Journal of Molecular Biology*, 323(5), pp.859-869

(ز) جنبه جدید بودن و نوآوری تحقیق از منظر دانشجو :

قابل ذکر است که تا کنون تغییری در ناحیه زانوی هسته دوست این لیپاز و جایگزینی آمینواسیدها در این بخش از مولکول گزارش نشده است و این تحقیق برای اولین بار انجام خواهد شد.

تاریخ / امضای دانشجو

جنبه جدید بودن و نوآوری تحقیق از نظر استاد راهنما :

تاریخ و امضاء استاد راهنما

